

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和2年5月31日

採択番号	2019-共同-16		
研究部門	感染症免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	<i>Babesia gibsoni</i> におけるアトバコン耐性関連遺伝子ならびに <i>B. odocoilei</i> 様原虫の疫学的調査		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いぐち あいこ 井口 愛子	鳥取大学農学部共同獣医学科獣医臨床検査教室・講師	
研究分担者			
	玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2019年4月1日 ~ 2020年3月31日		
目的・趣旨	<p>犬バベシア症はマダニ媒介性赤血球内寄生原虫である <i>Babesia gibsoni</i> によって引き起こされ、重要な溶血性貧血、黄疸、脾腫および血色素尿を呈し死に至ることもある犬の重要な感染症の一つである。治療にはアトバコン(ATV)が用いられ即効性があることが知られているが、再発しその再発原虫は ATV に対する感受性が低下することが問題となっている。ATV 感受性低下には推定標的部位における一塩基多型が報告されており、この一塩基多型を有する原虫が ATV 投与前にも存在する可能性を過去に示した。本研究では国内の犬バベシア症陽性検体におけるアトバコン耐性関連遺伝子の発現率の調査を検体数を増やして再調査する。</p>		
研究経過の概要	<p>マルピーライフテック株式会社に協力を依頼した。2015-2018 年における犬バベシア症を疑い検査を行った検体のうち、<i>B. gibsoni</i> 遺伝子検査陽性の検体の gDNA を収集した。これらの検体に関し、地域、犬種、性別、年齢の情報を得た。ただし、これらは検査会社に提出された検体であるため、既往歴、感染歴ならびに治療歴(ATV 投与歴の有無も含む)は調査できなかった。</p> <p>①検体情報、②一塩基多型検出のための検量線作成、③検体の一塩基多型保有率の計測を行った。</p> <p>①検体情報</p> <p>104 検体の gDNA を収集した。検体の年齢は 0-3 歳 36 検体、4-9 歳 32 検体、10-13 歳 26 検体、14 歳以上 3 検体、不明が 8 検体であった。雄 55 検体、雌 27 検体、去勢雄 6 検体、避妊雌 10 検体、不明が 7 検体であった。犬種は雑種が 33 検体で最も多</p>		

く、次いで不明が 20 検体、土佐犬 5 検体、ミニチュアダックスフンドおよびシェットランドシープドッグが各 4 検体、ラブラドルレトリバー、ヨークシャーテリア、ポメラニアン、パグおよびチワワが各 3 検体、バーニーズマウンテンドッグ、トイプードル、柴犬、ゴールデンレトリバーおよびアメリカンピットブルが各 2 検体、その他 14 犬種が各 1 検体であった。検体の提出があった都道府県を右図に示し、各検体数を地図上に表記した。香川県の 27 検体が最多であった。また神奈川県・茨城県・福島県・北海道の東日本地域からも検体が提出された。



②一塩基多型検出のための検量線作成

ATV に対する感受性の低下には *B. gibsoni* のミトコンドリアチトクローム *b* 領域における一塩基多型 M121I が関与している。塩基は 363 番目が G から T へと置換される。よって野生型 *B. gibsoni* 培養株ならびに M121I 型 *B. gibsoni* 培養株から gDNA を抽出し、TA-cloning を行い G および T をそれぞれ含むプラスミドを作成した。各プラスミドの濃度からコピー数を算出し、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^4$ コピー数を測定できる検量線を作成した。

③一塩基多型保有率の測定

②で作成した検量線を用いて、各検体の M121I 保有率を測定した。G および T を検出する各プライマーを用いて real-timePCR を実施した。gDNA はお悪測定において 25ng となるように調整した。結果は T のコピー数/(G のコピー数+T のコピー数)として算出した。全検体のうち M121I 保有率が計測できたのは 9/105 検体 (8.57%) であった。地域は上図の濃染部であり、高知県 (1・2) 21.06%、香川県 (3/27) 17.08%・14.75%・1.20%、大阪府 (1/9) 12.10%、神奈川県 (1/3) 7.99%、福岡県 (1/4) 3.02%、福島県 (1/2) 1.94%、北海道 (1/1) 1.69%、であった。

2011 年～2014 年に行った同様の調査と比較し、過去と同様に①オスに多い傾向にある、②年齢に目立った傾向はない、③犬種は雑種が多いものの一般的な家庭犬の割合に準じていた。過去の報告と異なる点は①M121I 保有率は若干増加(過去は 4.11%であった)、②大阪府は連続して M121I が検出されている、③今回初めて神奈川県・福島県・北海道の東日本地域から M121I が検出されたことであった。以上のことより感染地域の拡大もしくは人や犬の移動に伴い、犬バベシア症の発赤地域が拡大していることとその中に ATV 感受性低下原虫が少なからず含まれていることが示された。移動の有無、ATV 投与歴の有無、重症度などの情報を集めることができれば、さらに有用な調査になると思われる。

B. odocoilei 様原虫の疫学的調査は十分な検体数を収集できず、十分な検討ができなかった。

研究成果の概要

研究成果の発表

2020 年度における WJVF 第 11 回大会もしくは第 41 回動物臨床医学会年次大会での発表を検討していた。しかし両大会ともに新型コロナウイルス感染症拡大防止の観点から開催中止が決定し、本データは未発表である。
現在、論文を執筆中である。